第8卷 第2期
1987年5月

动 物 学 研 究
ZOOLOGICAL RESEARCH

Vol. 8, No. 2
May, 1987

鸡输卵管胞液中雌激素受体的性质研究

佘微明

（中国科学院上海生物化学研究所）

摘 要

以乙蔗酚(DES)刺激未成年的雌鸡，输卵管增长到0.6到1.0克，胞液中含有的雌激素受体为0.082微微克分子/毫克蛋白，此种受体表现有以下的特性。

1.专一地结合雌性激素。以雌二醇作配基时平衡解离常数是 $0.25\times10^{-9}M^{-1}$；在输卵管胞液中该受体的结合位点是1356/细胞。

2.硫酸铵沉淀胞液中的雌激素受体已转变成为团聚状态，如在硫酸铵沉淀的过程中有钼酸钠存在则能明显地减少团聚，因此钼酸钠有防止胞液中受体团聚的作用。

3.胞液中雌激素受体进行DEAE—葡聚糖凝胶柱层析，不论有或无钼酸钠存在，均表现为一个单一的峰。

关键词 鸡 输卵管 胞液 雌激素受体

鸡输卵管是研究甾体激素作用机制的常用材料（O'Malley, 1978）。曾有一些报道描述了鸡输卵管雌激素受体的部分性质（Best-Belpomme, 1975; Smith, 1979; Cox, 1971; Harrison, 1975），如激素结合专一性，在低盐和高盐情况下的沉降系数等。本文利用DES刺激小鸡输卵管作为材料，报道了它的另一些性质，包括与配基结合的动力学分析，钼酸钠对受体的稳定作用，DEAE—葡聚糖层析行为等。

材 料 和 方 法

1.**材料** 肝素、抑酶醛肽为Sigma产品，DEAE—葡聚糖（DEAE-sephacel）为pharmacia产品，〔2, 4, 6, 7-^{3}H〕—雌二醇为Amersham放化中心产品（比度99居里/毫克分子），DES及非同位素标记的甾体激素系法国Roussel-Uclaf产品。

2.**动物** 约20天的雌性小鸡，肌肉注射配制在麻油中的DES，2.5毫克/天，连续15—18天，停药4天，杀死动物，迅速取出输卵管，冷却后立即使用，也可以液氮保存。

* 本文1985年10月30日收到，1886年7月4日收到修改稿。

3.胞液的制备 鸡输卵管秤重，剪碎，加入7倍体积的缓冲液，用玻璃匀浆器在冰浴中制成匀浆，加入抑酶醛肽（$1\times10^{-7}M$），在200,000g离心1小时，吸去上层飘浮着的脂肪，上清即胞液。

缓冲液TED:10mM Tris，1mM EDTA，1mM DTT，pH7.4；TEM：含有20mM Na_2MOO_4的TED；PB：10mM磷酸钠，1mM EDTA，10mM β-巯基甘油，pH7.4；PBM含有20mM Na_2MoO_4的PB。以下实验除特别注明外均在TEM缓冲液中进行。

4.雌二醇结合量和激素结合专一性的测定 结合量测定系用活性炭外套葡聚糖(DCC)法(Milgrom，1972)。结合专一性的测定系以胞液与[^{3}H]—雌二醇（$3\times10^{-9}M$）保温的同时加入1000倍非标记的甾体激素作为竞争物和0.5M硫氰化钠，在0°C保温16小时，测定[^{3}H]—雌二醇的结合量，有竞争作用者结合量减少。

5.动力学常数的测定 （1）饱和分析：一定量的胞液雌激素受体与不同浓度的[^{3}H]—雌二醇（10^{-10}—$10^{-8}M$）在0°C保温16小时，测定[^{3}H]—雌二醇的结合量。

（2）结合速度常数：系将胞液雌激素受体与[^{3}H]—雌二醇（$2\times10^{-9}M$)，在0°C保温，隔若干时间取出一定量测定雌二醇的结合。

（3）解离速度常数：胞液雌激素受体与[^{3}H]—雌二醇$2\times10^{-9}M$在0°C保温12到16小时之后，形成了受体—雌二醇复合物，用DCC处理除去游离的激素，然后分成二份，分别观察0°C及25°C时的解离速度，反应开始时各加入1%体积的非标记雌二醇使最终浓度为$1\times10^{-6}M$，隔若干时间取出一定量，测定雌二醇的结合量。

6.蔗糖密度梯度离心 用TEM或TED配制5—20%蔗糖密度梯度溶液，在梯度溶液上放0.2毫升雌激素受体—雌二醇复合物，Beckman离心机sw60转头，194,000g离心16小时，^{14}C-牛血清白蛋白（4S）作为内标准，离心完后从管子底部收集，测放射性。

7.DEAE-葡聚糖层析 DEAE-葡聚糖凝胶（DEAE-Sephacel）7毫升，装入直径为1.1厘米的层析柱中，在PBM缓冲液中制备之胞液雌激素受体以[^{3}H]—雌二醇标记之后取10毫升上柱，上柱时流速为0.16毫升/分钟，然后用0—0.4M氯化钾梯度（总体积80毫升）洗脱，记录洗脱液中的放射性；将放射活性高峰部位的两侧分开合并，稀释降低盐浓度后，在PB缓冲液中分别加在二个相同的装有DEAE-葡聚糖0.5毫升的柱上，以0—0.6M氯化钾梯度洗脱（总体积20毫升）。离子强度则用电导仪测。

8.蛋白测定用考马氏兰法 （Bradford，1976），以牛血清白蛋白作标准。DNA的测定用Burton（1956）法，以牛胸腺DNA作标准。细胞结合位点的测定是按照每二倍体基因组含2.3pg DAN计算（Common，1951）。

结　果

1.小鸡输卵管胞液中雌激素受体的激素结合专一性 胞液雌激素受体与[^{3}H]—雌二醇反应的同时，加入过量的非标记激素作为竞争物，竞争后的结合量见表1。雌二醇、雌三醇，雌酚酮有明显的竟争作用，孕酮则几乎无竞争，睾酮和可的松也甚少，表现了雌激素受体的特征。

2.胞液雌激素受体与配基反应的动力学常数 饱和分析结果见图1；从Scatchard图

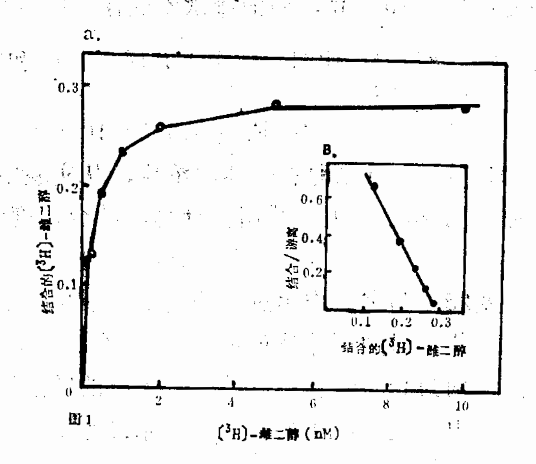


图 1 a.胞液雌二醇结合量的饱和分析，已除去非特异性结合 B. Scatchard图解

表 1 几种甾体激素对胞液〔³H〕—雌二醇结合的竞争作用

甾体激素名称	竞争后的结合量（%）
—	100
雌二醇	7
雌三醇	12
雌 酮	17
睾 酮	80
孕 酮	94
可的松	69

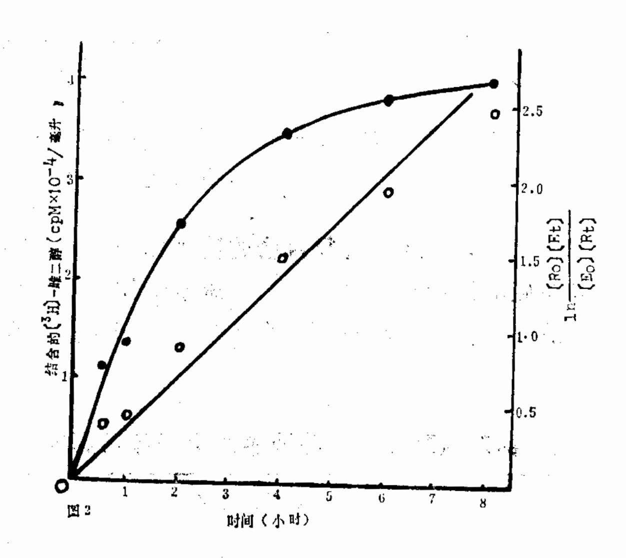
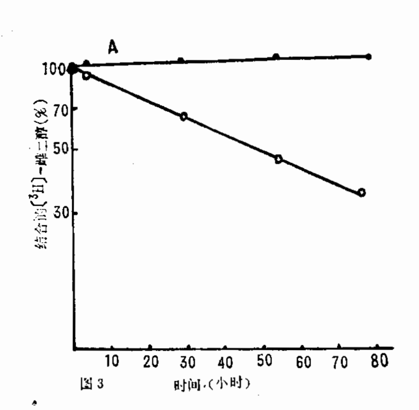


图 2 胞液雌激素受体和〔³H〕—雌二醇的结合反应过程•-•系不同时间〔³H〕—雌二醇的结合量，已除去非特异性结合，o-o系不同时间计算得之 $\ln\frac{(Ro)(Et)}{(Eo)(Rt)}$ 值

解计算得平衡解离常数是$0.25\times10^{-9}M$，胞液雌激素受体的结合位点是1356/细胞。

结合速度系以 t 对$\ln\left(\frac{[R_o][E_t]}{[E_o][R_t]}\right)$作图，式中 t 是时间，$E_o$和$R_o$分别表示〔³H〕—雌二醇和受体的起始浓度，$E_o$是 $2\times10^{-9}M$，R_o是$0.675\times10^{-9}M$（即胞液雌二醇的结合量），E_t和R_t分别表示 t 时〔³H〕|雌二醇和受体的浓度，从实验中测得，结果见图 2，图中直线符合双分子反应动力学，根据直线斜率计算得结合速度常数K_+为3.22×10^{6} M^{-1}分$^{-1}$。

解离速度分别在 0 °C及25°C测定，作用过程符合于一级反应动力学，见图 3。根据图中直线斜率计算在 0 °C及25°C时的解离速度常数K_-，是2.3×10^{-4}分$^{-1}$和5.3×10^{-2}分$^{-1}$；解离50%所需时间分别为49小时和13分钟；25°C时的解离速度约为0°C的230倍。在未加非标记雌二醇的实验中检验胞液雌激素受体—雌二醇复合物的稳定性，在 0 °C反应76小时或在25°C反应1.5小时均未见明显失活。



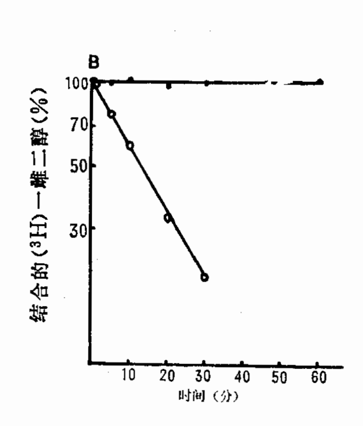


图 3　胞液雌激素受体—雌二醇复合物的解离反应 A．0 °C；B．25°C。
-○-系不同时间的解离作用；-●-系复合物在反应过程中的稳定性

3．钼酸钠对胞液雌激素受体—雌二醇复合物的稳定作用　在 TED 缓冲液中制备的胞液雌激素受体，在30%硫酸铵饱和度时有81%的激素受体一雌二醇复合物沉殿，而在有钼酸钠的 TEM 缓冲液中制备者，硫酸铵浓度必须达到40%饱和度时才能使大部分复合物沉淀（见表 2）。

表 2　钼酸钠对硫酸铵沉淀胞液雌激素受体的影响

	硫酸铵饱和度%	回收*%
胞液	30	81
	40	94
胞液 + 20mM $MoO_4^{=}$	30	23
	40	72

蔗糖密度梯度离心分析的结果见图 4，在 TED 缓冲液中的胞液雌激素受体的沉降系数为7.2S（图4 A），在TEM缓冲液中则为7.1S（图4 B）；将二种缓冲液中所得的硫酸铵沉淀分别溶解，再用蔗糖密度梯度离心分析，在没有钼酸钠存在时激素受体—雌二醇复合物成为团聚状态（图4 c），在有钼酸钠存在时沉降系数为6.9s（图4 D）很少团聚物。

4.胞液雌激素受体的DEAE-葡聚糖层析行为 胞液雌激素受体在有钼酸钠存在的PBM缓冲液中吸附在DEAE-葡聚糖凝胶柱上，在氯化钾梯度洗脱时出现一个单一的峰，氯化钾的浓度相当于0.21M，见图5 A；将此峰顶端两侧加在二个以PB缓冲液平衡的DEAE-葡聚糖凝胶柱上，氯化钾梯度洗脱仍得到单一的峰，高峰洗出时所需氯

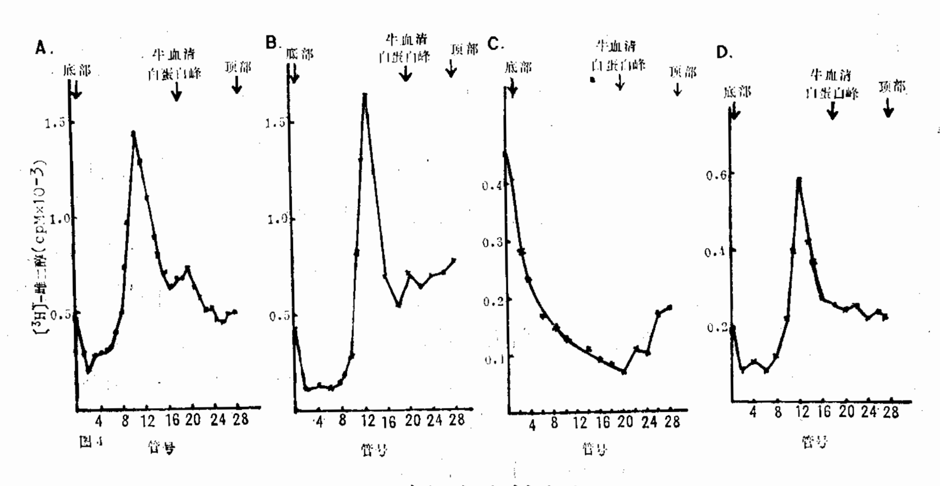


图 4　蔗糖密度梯度离心

A.胞液制备在TED缓冲液中，[^{3}H]—雌二醇标记之后，加入DCC除去游离激素，B.胞液在TEM缓冲中其余同A.；C.胞液处理同A，30%硫酸铵沉淀后，沉淀溶解，低速离心除去不溶物，上清取用；D.胞液处理同B，40%硫酸铵沉淀，其余同C

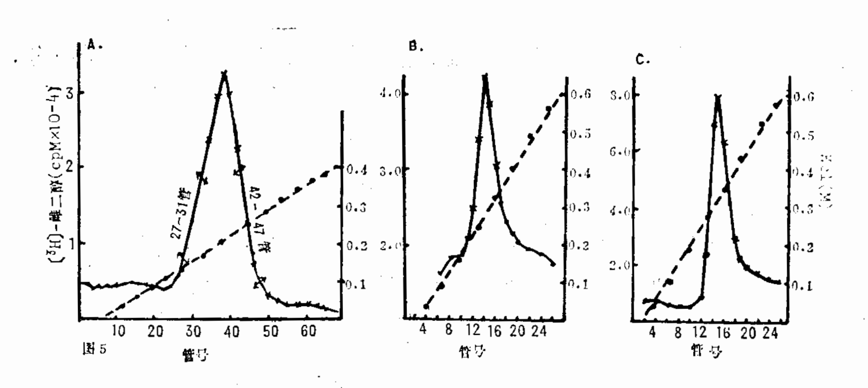


图 5　DEAE-葡聚糖层析

A. 0—0.4M氯化钾洗脱吸附在DEAE-葡聚糖凝胶柱上的激素受体，洗脱液分管收集，每管1毫升，合并27—32管（B）、42—47管（C），分别加在二个DEAE-葡聚糖凝胶柱上，0—0.6M氯化钾梯密洗脱-×-系放射性比度，---系氯化钾浓度

化钾的浓度均为0.25M，见图5B、5C，这表明在上述实验条件下胞液雌激素受体只出现一个蛋白吸收峰，但在有或无钼酸钠时氯化钾洗脱的浓度有差异。

讨　论

1.小鸡输卵管是一个对雌激素的刺激十分敏感的组织，但取材甚为困难，4—6星期的小鸡输卵管仅30—50毫克（湿重）总共只含有0.2微微克分子的胞液雌激素受体，这就为对此组织中受体的研究带来局限性。已知雌激素类化合物刺激小鸡，可使输卵管迅速地增长，组织分化（Oka，1969），同时雌激素受体转移到细胞核内，如撤消刺激则细胞核内的雌激素受体又回转入细胞浆（Sutherland，1976）；Gschwendt 用含 DES 的塑料小管植入肌肉以刺激输卵管增生，以后再撤消刺激，使胞液中的雌激素受体的含量增加；本文中描述的DES连续注射，停药后隔4天处死动物的方法，可使输卵管增长到0.6到1.0克（湿重），其中含胞液受体约3.6微微克分子。

2.文献上一般认为钼酸钠对激素受体的作用是抑制转化，也就是使受体稳定在不能和细胞核结合的非活化型，根据牛子宫雌激素受体研究的报道（Redeuilh，1981），钼酸钠可使雌激素受体在低盐状况下稳定在9s的构型而不团聚。至于对鸡输卵管雌激素受体的研究，在用硫酸铵分级沉淀胞液雌激素受体时，体系中有无钼酸钠是不相同的，在无钼酸钠时较低的硫酸铵饱和度就可使之沉淀，可能在低盐无钼酸钠时受体已成为团聚状态，所以易被较低浓度的硫酸铵沉淀，由蔗糖密度梯度离心检验，确实已成为团聚物；在有钼酸钠时所得到的硫酸铵沉淀用蔗糖密度梯度离心分析显示了与原受体相似的沉降系数，由此看来钼酸钠确有防止受体团聚的作用。

3.自从孕激素受体在DEAE-纤维离子交换层析过程中分离出A和B两种组分（Schrader，1972；Dougherty，1982）之后，人们开始探讨其他的甾体激素受体是否也存在着相似的两种组分；Ruh（1983）等报道牛子宫雌激素受体可在DEAE-葡聚糖层析中分离出二个峰，氯化钾梯度洗脱分别在0.21M及0.25M洗出；在本工作中小鸡输卵管胞液中的雌激素受体照Ruh等所述条件，用DEAE-葡聚糖层析分离，不管系统中有无钼酸钠都出现一个峰，因此在本实验条件下雌激素受体并不存在不同的分子组分，是否有假象尚待今后深入探讨。

参 考 文 献

Best-Belpomme, M. *et al.* 1975 Oestrogen receptors in chick oviduct. *Eur. J. Biochem.*, 57, 537

Burton, K. 1956 A study of the condition and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, 62, 315

Bradford, M. M. 1976 A rapid and sensitive method for the, quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248

Common, R. H. 1951 *et al.* The effect of gonadal hormones on the nucleic acid content of liver and serum in the immature pullet, and the difference between the nucleic acid content of the livers of sexually mature pullets and cockerels. *Can.* J. Zool., 29, 265

Cox, R. F. *et al.* 1971 Studies on the mode of action of oestradiol on chicken oviduct. *Eur. J.*

Biochem., 22, 46

Dougherty, J. J. and Toft, D. O. 1982 Characterization of two 8S forms of chick oviduct progesterone receptor. *J. Biol.Chem.*, 257, 3113

Gschwendt, M. 1980 DNA-binding ability and partial purification of the cytoplasmic estrogen receptor from chicken oviduct. *Biochim. Biophys. Acta*, 627, 281

Harrison, R. W. and Toft, D. O. 1975 Estrogen receptors in chicken oviduct. *Endocrinology*, 96, 199

Milgrom, E, *et al.* 1972 Progesterone in uterus and Plasma V. An assay of the progesterone cytosol receptor of the guinea pig uterus. *Endocrinology*, 90, 1064

Nishigori, H. and Toft, D. O. 1980 Inhibition of progesterone receptor activation by sodium molybdate. *Biochem.*, 19, 77

Oka, T. and Schimke, R. T. 1969 Interaction of estrogen and progesterone in chick oviduct development. *J. Cell Biology*, 43, 123

O'Malley, B. W. *et al.* 1978 The ovalbumin gene organization, structure, transcription, and regulation. *Recent Prog. Horm. Res.*, 35, 1

Redeuilh, G. *et al.* 1981 Calf uterine estradiol receptor. *J. Biol. Chem.*, 256, 11496

Ruh, M. F. *et al.* 1983 Estrogen and antiestrogen binding to different forms of the molybdate-stabilized estrogen receptor. *Endocrinology*, 112, 2203

Schrader, W. T. and O'Malley, B. W. 1972 Progesterone-binding components of chick oviduct. *J. Biol. Chem.*, 247, 51

Shyamala, G. and Leonard, L. 1980 Inhibition of uterine estrogen receptor transformation by sodium molybdate. *J. Biol. Chem.*, 255, 6028

Smith, R. G. *et al.* 1979 Two estrogen receptors in reproductive tissue. *J. Steroid Biochem.*, 10, 31

Sutherland, R. L. and Baulieu, E. E. 1976 Quantitative estimates of cytoplasmic and nuclear oestrogen receptors in chick oviduct. *Eur. J. Biochem.*, 70, 531

CHARACTERIZATION OF CYTOPLASMIC ESTROGEN RECEPTOR IN CHICKEN OVIDUCT

She Weiming

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academic Sinica)

1. Three-week-old female chickens received intramuscular injection of diethylstilbestrol (2.5 mg per day) 15—18 days and then a short term withdrew. Large chicken oviducts containing an higher amount of the cytoplasmic estrogen receptors could be obtained.

2. It exhibited high affinity for estradiol with an apparent equilibrium association constant $Ka=0.25\times10^{-9}$ *M*. The binding of [^{3}H]-estradiol was abolished by 3×10^{-6} *M* estriol and estrone but not by the same concentration of progesterone, testosterone and cortisol. The estimated number of binding sites per cell was about 1356, as calculated from DNA content of chicken diploid genome.

3. There was only one single class of binding sites for estrogenic compounds at the receptor as manifested in second order association rates and first order dissociation rates.

4. In low salt cytosol, without molybdate, the estradiol-receptor complex was precipitated by ammonium sulfate at 30% saturation. On sucrose gradient it was aggregated. However, a sharp, well defined receptor peak appeared when molybdate was present in all preparation.

5. Only one component could be obtained from DEAE-sephadex column with a linear KCl gradient.

Key words Chicken Oviduct Cytoplasmic Estrogen Receptor